sebia

CAPILLARYS IMMUNOTYPING

Ref. 2100





2014/06

UTILIZACIÓN

El kit CAPILLARYS IMMUNOTYPING permite la detección y caracterización en medio alcalino (pH 9,9) de las proteínas monoclonales (inmunotipado) en el suero y la orina humanos, mediante electroforesis capilar en el sistema automático CAPILLARYS. Debe usarse con el kit CAPILLARYS PROTEIN(E) 6, SEBIA, que permite separar las proteínas en seis fracciones principales.
El sistema CAPILLARYS permite realizar todas las etapas de la electroforesis hasta la obtención de los perfiles proteicos para su análisis cualitativo.
Cada muestra de suero u orina que se analiza se mezcla con antisueros de diferentes especificidades, anti-cadenas pesadas gamma (Ig G), alfa (Ig A) y mu (Ig M) y anti-cadenas ligeras kappa y lambda (libres y ligadas).
Todas las proteínas, separadas en capilares de sílice fundido, son detectadas directamente en una burbuja existente en el capilar mediante espectrofotometría de absorbancia a 200 nm.
Después, los perfiles electroforéticos son analizados visualmente para detectar las anomalías y caracterizar las proteínas monoclonales detectadas.

Para uso en diagnóstico *In Vitro*.

NOTA : En estas instrucciones, el nombre "CAPILLARYS" es usado para designar los sistemas automáticos CAPILLARYS, CAPILLARYS 2 y CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING, SEBIA.

PRINCIPIO DEL TEST

La electroforesis de proteínas de la orina o el suero humanos es un análisis muy útil en el laboratorio de análisis clínicos para investigar las modificaciones del perfil proteico. Paralelamente a las técnicas de electroforesis en diferentes soportes, entre los que está el gel de agarosa, se ha desarrollado la técnica de la electroforesis capilar, que ofrece las ventajas de una automatización completa del análisis, separaciones rápidas y una buena resolución. Se define como una técnica de separación electrocinética realizada en un tubo de diámetro interno inferior a 100 µm lleno de un tampón compuesto por electrolitos. Se considera una tecnología intermedia entre la electroforesis de zona en soporte y la cromatografía líquida.
El sistema CAPILLARYS usa el principio de la electroforesis capilar en solución libre, que representa la forma más corriente de electroforesis capilar. Permite la separación de moléculas cargadas en función de su movilidad electroforética propia en un tampón de un pH dado y, según el pH del electrolito, de un flujo electroendosmótico más o menos importante.
Las inmunoglobulinas monoclonales, marcadores de gammapatías, son detectadas durante la electroforesis de proteínas. En la electroforesis capilar, se presentan en forma de picos anormales situados esencialmente en las zonas beta o gamma del perfil electroforético. En las técnicas CAPILLARYS IMMUNOTYPING y CAPILLARYS IMMUNOTYPING URINE, el inmunotipado se realiza usando antisueros monoespecíficos y permite la identificación de los picos monoclonales detectados en la electroforesis.
El sistema CAPILLARYS posee 8 capilares en paralelo. En este sistema, la muestra que se va a analizar es inyectada, por aspiración en el ánodo, simultáneamente en seis capilares. Para el inmunotipado, el perfil proteico de referencia (perfil ELP) se obtiene mediante inyección de la muestra en presencia de la solución ELP en el capilar n° 1. Los perfiles de los antisueros se obtienen por inyección de la misma muestra en presencia de los antisueros de diferentes especificidades anti-Ig G, anti-Ig A, anti-Ig M, anti-Kappa y anti-Lambda, en los cinco capilares siguientes (n° 2 a 6).
La separación se realiza a continuación aplicando una diferencia de potencial de varios miles de voltios en los extremos de cada capilar, y la detección directa de las proteínas se efectúa a 200 nm en el lado catódico. Los capilares se lavan entre cada análisis con una solución de lavado y luego con tampón de análisis.
La superposicion de uno de los perfiles de antisuero con el perfil ELP permite visualizar la desaparición y / o la disminución de un pico monoclonal en el perfil del antisuero y tipar una gammapatía.
NOTA : Con el tampón de pH alcalino usado, el orden de migración de las proteínas es el siguiente, del cátodo al ánodo : gamma globulinas, beta-2 globulinas, beta-1 globulinas, alfa-2 globulinas, alfa-1 globulinas y albúmina. Cada fracción contiene uno o varios constituyentes. El complejo inmunoglobulinas de la muestra (orina o suero) - inmunoglobulinas del antisuero específico aparece en una posición muy anódica (en la zona entre alfa-1/albúmina o más anódico que la albúmina).

El innunotipado se realiza en cuatro etapas :
1. Dilución del suero o de la orina dializada con un diluyente específico contenido en el pocillo doble del segmento de antisueros. La dilución se adapta a la concentración de inmunoglobulinas de la muestra.
2. Mezcla de la muestra diluida con los diferentes antisueros. El complejo antígeno-anticuerpo se forma rápidamente en el medio líquido sin etapa de incubación ni de precipitación.
3. Inyección de las muestras tratadas por aspiración en 6 capilares (en la parte anódica), seguida de separación electroforética de las proteínas en medio alcalino mediante la aplicación de una diferencia de potencial de varios miles de voltios en los extremos de los capilares. La detección directa de las proteínas se efectúa a 200 nm (en el lado catódico).
4. Superposición del perfil ELP en los perfiles de los antisueros (Ig G, Ig A, Ig M, Kappa y Lambda), lo que permite la caracterización de la proteína monoclonal.

REACTIVOS SUMINISTRADOS EN EL KIT CAPILLARYS IMMUNOTYPING

ATENCIÓN : Ver las fichas de datos de seguridad.

SEGMENTOS DE ANTISUEROS

Preparación

Los 60 segmentos de antisueros están listos para usar y permiten analizar una muestra cada uno. Están compuestos por 7 pocillos que contienen respectivamente :
- un medio de base (solución ELP, amarilla),
- inmunoglobulinas totales de mamífero anti-cadenas pesadas gamma (rosa),
- inmunoglobulinas totales de mamífero anti-cadenas pesadas alfa (azul oscuro),
- inmunoglobulinas totales de mamífero anti-cadenas pesadas mu (verde amarillento),
- inmunoglobulinas totales de mamífero anti-cadenas ligeras kappa libres y ligadas (verde claro),
- inmunoglobulinas totales de mamífero anti-cadenas ligeras lambda libres y ligadas (azul claro),
- un diluyente específico para la dilución de los sueros y las orinas dializadas, que contiene un marcador que permite superponer los perfiles de forma óptima.

Cada reactivo tiene un color específico. Los segmentos tienen una forma característica y un saliente que evita colocarlos al revés en los cargadores de muestras del sistema CAPILLARYS.

Uso

Segmentos de un solo uso para el inmunotipado de las proteínas mediante electroforesis en el sistema automático CAPILLARYS.
Deben colocarse en el cargador de muestras después de haber retirado la lámina que los recubre.

IMPORTANTE : Antes de sacar la lámina que cubre el segmento, compruebe que no haya gotas de reactivo en lo alto de los 6 pocillos y, si se observan gotas, gire el segmento con un movimiento rápido para que las gotas se reúnan con el resto de la solución en el fondo del pocillo.

ATENCIÓN : Manipule con precaución los segmentos de antisueros que contengan muestras biológicas.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

Los segmentos de antisueros deben conservarse en nevera (entre 2 y 8 °C). Son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el kit. NO LOS CONGELE.

NOTA : Durante el transporte, los segmentos de antisueros pueden permanecer a temperatura ambiente (entre 15 y 30 °C) durante 15 días sin que la calidad del test se vea afectada.

ATENCIÓN : No use agua destilada o desionizada comercial, como por ejemplo el agua para planchar (riesgo de deterioro importante de los capilares). Use exclusivamente agua de calidad ultrapura, como el agua para inyección.

ANÁLISIS DE SUEROS : TÉCNICA CAPILLARYS IMMUNOTYPING

REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

ATENCIÓN : Ver las fichas de datos de seguridad.

1. KIT CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 (SEBIA, referencia 2003)

Presentación, conservación, estabilidad y señales de deterioro

Vea las instrucciones del kit.

ATENCIÓN : No use los segmentos de dilución contenidos en el kit CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 para la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING.

2. AGUA DESTILADA O DESIONIZADA

Uso

Para la limpieza de los capilares del aparato automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS, SEBIA.
Se recomienda usar agua destilada o desionizada filtrada (con un filtro de porosidad ≤ 0,45 µm) y con una resistividad superior a 10 Megaohmios x cm.
Renueve el agua cada día para evitar contaminaciones microbianas.
Para un funcionamiento óptimo, se recomienda añadir 350 µL/L de CLEAN PROTECT (SEBIA, referencia n° 2059 : 1 vial de 5 mL).

IMPORTANTE : Se recomienda lavar el contenedor de limpieza con agua destilada o desionizada en abundancia antes de llenarlo.

3. CAPICLEAN

Presentación

El vial de la solución enzimática concentrada CAPICLEAN (SEBIA, referencia nº 2058 : 1 vial de 25 mL) contiene : enzimas proteolíticos, surfactantes y componentes inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

Uso

Para la limpieza de la cánula de muestras del aparato automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS, SEBIA, durante el ciclo de limpieza CAPICLEAN.

IMPORTANTE :

- Cuando se realicen menos de 500 análisis a la semana, haga un ciclo de limpieza con CAPICLEAN al menos una vez por semana.
- Cuando se realicen menos de 500 análisis al día pero más de 500 análisis a la semana, haga un ciclo de limpieza con CAPICLEAN cada 500 análisis.
- Cuando se realicen más de 500 análisis al día, haga un ciclo de limpieza con CAPICLEAN una vez al día.

Consulte la hoja de instrucciones del CAPICLEAN, SEBIA.

IMPORTANTE: Después de la limpieza de la cánula de muestras, no reutilice el segmento de dilución.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

El CAPICLEAN debe conservarse en nevera (entre 2 y 8 °C). Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial. NO LO CONGELE.
Pueden observarse un precipitado o partículas agregadas en suspensión (flóculos) en el vial del CAPICLEAN sin que su funcionamiento se vea afectado.
No resuspenda el precipitado o las partículas. Se recomienda pipetear sólo el sobrenadante.

4. SOLUCIÓN DE HIPOCLORITO DE SODIO (para la limpieza de la cánula de muestras)

Preparación

Prepare una solución de hipoclorito de sodio (lejía) con un 2 - 3 % de cloro, a partir de una dosis concentrada de 250 mL con un 9,6 % de cloro diluida hasta 1 litro (volumen final) con agua destilada o desionizada fría.

Uso

Para la limpieza de la cánula de muestras del aparato automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS, SEBIA (mantenimiento semanal para eliminar proteínas adsorbidas a la cánula).

Vea las instrucciones de uso del CAPILLARYS, SEBIA.

- Use el cargador específico para el mantenimiento (n° 100).
- Coloque en el cargador, en la posición 1, un tubo de hemólisis con 2 mL de la solución de hipoclorito de sodio preparada anteriormente.
- Introduzca el cargador n° 100 de mantenimiento en el sistema CAPILLARYS.
- En el menú de la ventana "MANTENIMIENTO" que aparecerá en pantalla, seleccione la opción "Iniciar la limpieza de la cánula (solución de hipoclorito de sodio)", y luego valide.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

La solución de hipoclorito de sodio diluida puede conservarse 3 meses a temperatura ambiente en un recipiente de plástico cerrado herméticamente, protegido de los rayos solares y de cualquier fuente de calor o ignición, y alejado de los ácidos y del amoniaco.

5. SOLUCIÓN DE LAVADO CAPILLARYS / MINICAP

Preparación

Cada vial de solución de lavado concentrada (SEBIA, referencia n° 2052: 2 viales de 75 mL) debe completarse hasta 750 mL con agua destilada o desionizada.
Después de la dilución, la solución de lavado contiene una solución alcalina pH ≈ 12.

Uso

Para lavar los capilares del CAPILLARYS. Reactivo adicional necesario en caso de realizar series inferiores a 40 análisis.

IMPORTANTE : Antes de llenar el contenedor de solución de lavado, se recomienda lavar con agua destilada o desionizada en abundancia el cuello del contenedor, el conector y el tubo para evitar la acumulación de sales.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

Las soluciones de lavado concentrada y diluida deben conservarse a temperatura ambiente o en nevera en contenedores cerrados para evitar la evaporación. La solución concentrada es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial.
La solución diluida es estable durante 3 meses.
Deseche la solución de lavado diluida si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana.

NOTAS :

Las pruebas realizadas durante la validación de los reactivos muestran que, para las diferentes soluciones y usando material adaptado al volumen a reconstituir, una variación del volumen final de un ± 5 % no tiene ningún efecto adverso en el análisis.
El agua destilada o desionizada, usada para la reconstitución de las soluciones, debe estar exenta de contaminación bacteriana o fúngica (use un filtro ≤ 0,45 µm) y debe tener una resistividad superior a 10 Megohms x cm.

EQUIPAMIENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS

1. Sistema de electroforesis capilar CAPILLARYS SEBIA : CAPILLARYS referencia n° 1220, CAPILLARYS 2 referencia n° 1222 ó CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING referencia n° 1227.
2. Cargadores de muestras, suministrados con el sistema CAPILLARYS.
3. Contenedores de plástico suministrados con el sistema CAPILLARYS : contenedor para la limpieza de los capilares (debe llenarse con agua destilada o desionizada), contenedor de solución de lavado y contenedor de desechos.

MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS

Extracción y conservación de las muestras

El análisis se hace con sueros frescos. Los sueros deben obtenerse según los procedimientos establecidos de uso en el laboratorio clínico.
Las muestras pueden conservarse un máximo de 10 días en nevera (entre 2 y 8 °C).
Para conservaciones más prolongadas, congele las muestras rápidamente (como máximo durante las 8 horas siguientes a su obtención). Los sueros congelados son estables 1 mes.

NOTA : No conserve los sueros a temperatura ambiente.

Las proteínas de los sueros conservados entre 2 y 8 °C se degradan, en particular el complemento C3.

Preparación de las muestras

Use directamente muestras de suero sin diluir.
Después de conservarlos en nevera (entre 2 y 8 °C) o congelarlos, algunos sueros (especialmente aquellos que contengan una crioglobulina o un criogel) se vuelven viscosos o turbios. Una vez que hayan alcanzado el estado líquido se pueden analizar directamente.
Igualmente, los sueros que contengan una inmunoglobulina polimerizada pueden analizarse directamente, sin ningún tratamiento previo.
Se recomienda observar el aspecto del suero antes del análisis (por si hay hemólisis, presencia de crioglobulinas o turbidez).

Muestras a descartar

- No use muestras de suero antiguas o mal conservadas, ya que las fracciones beta estarían muy modificadas.
- No use muestras de plasma. El fibrinógeno migra en posición beta-2 (pico adicional contenido en beta-2).

NOTA : Los tubos de extracción de muestras biológicas están descritos en la documentación disponible sobre la fase preanalítica de los análisis clínicos (datos suministrados por los fabricantes de tubos, guías y recomendaciones sobre la obtención de muestras biológicas…). En ausencia de indicaciones en las instrucciones sobre el tipo de tubo a usar, consulte esta documentación, y para las dimensiones del tubo a usar consulte el documento de SEBIA "Características de los tubos a usar según el instrumento". La fase preanalítica debe realizarse con la tecnología más avanzada y siguiendo las diferentes recomendaciones, incluyendo las suministradas por los fabricantes de tubos, cumpliendo la reglamentación aplicable.

PROCEDIMIENTO

El sistema CAPILLARYS es un instrumento multiparamétrico automático que permite realizar el análisis de las proteínas séricas en 6 capilares en paralelo con la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING, según las etapas siguientes :

- lectura de los códigos de barras de los tubos primarios y del cargador de muestras ;
- dilución de las muestras a partir del tubo primario ;
- mezcla del suero con la solución ELP y con los antisueros de las diferentes especificidades ;
- lavado de los capilares ;
- inyección de las muestras diluidas ;
- separación y detección directa de las proteínas en los capilares.

Las etapas manuales son las siguientes :

- colocación de los tubos primarios en los cargadores de muestras ;
- colocación de un segmento de antisueros destapado en cada cargador ;
- introducción en el sistema CAPILLARYS ;
- recuperación de los cargadores después del análisis.

Un análisis electroforético previo efectuado en el sistema CAPILLARYS con el kit CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 habrá permitido seleccionar las muestras en las que el perfil proteico presenta un pico anormal mediante un examen visual.

LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL CAPILLARYS.

I. PREPARACIÓN DEL ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO

1. Seleccione las muestras cuyo perfil proteico obtenido usando la técnica CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 ha permitido detectar un pico anormal después del análisis cualitativo.
2. Encienda el CAPILLARYS y el ordenador de control.
3. Abra el programa de gestión PHORESIS (CAPILLARYS) y valide el nivel de los reactivos, tras lo cual el aparato se iniciará automáticamente. Después de unos 10 minutos el sistema CAPILLARYS estará listo para trabajar.
4. Debe seleccionar el modo de dilución que se aplicará automáticamente a cada muestra según su concentración de inmunoglobulinas :
   • "HIPERGAMMA" si la concentración de inmunoglobulinas es superior a 20 g/L (caso de hipergammaglobulinemia),
   • "HIPOGAMMA" si la concentración de inmunoglobulinas es inferior a 8 g/L (caso de hipogammaglobulinemia),
   • "ESTÁNDAR" en el resto de casos (es el modo de dilución seleccionado por defecto).
5. Para el análisis de sueros, use el kit CAPILLARYS IMMUNOTYPING con el programa de análisis "IMMUNOTYPING 6" y el tampón de análisis CAPILLARYS PROTEIN(E) 6. Para seleccionar el programa de análisis "IMMUNOTYPING 6" y colocar en su sitio el contenedor del tampón CAPILLARYS PROTEIN(E) 6, lea detenidamente el manual de instrucciones del CAPILLARYS.

   NOTA : El paso de la técnica CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 a la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING (e inversamente) no requiere cambiar el contenedor del tampón.
6. Coloque 1 solo tubo primario en la posición 1 de cada cargador de muestras, de forma que el código de barras del tubo esté orientado hacia la ventana de lectura. Si la muestra colocada en el cargador no forma parte de los sueros seleccionados previamente, se aplicará el modo de dilución "ESTÁNDAR".
7. Para cada muestra que vaya a analizar, coja un segmento de antisueros nuevo, saque la lámina de plástico que lo precinta y colóquelo en el mismo cargador que el tubo primario (en caso de ausencia del segmento, el cargador será expulsado).

   NOTA : Los segmentos tienen una forma característica, con un saliente que evita colocarlos al revés en los cargadores de muestras del sistema CAPILLARYS.
8. Introduzca el (o los) cargador(es) con un tubo primario y el segmento de antisueros en el sistema CAPILLARYS por el orificio de entrada situado en medio del aparato. Se pueden introducir hasta trece cargadores de muestras a la vez, pudiéndose añadir nuevos cargadores de forma continua a medida que se vaya completando el análisis de los cargadores ya introducidos.
9. Saque de la cinta de salida, situada a la izquierda del aparato, los cargadores ya analizados.
10. Coja con precaución el segmento de antisueros usado y deséchelo.

   ATENCIÓN : Manipule con precaución los segmentos de antisueros que contengan muestras biológicas.

DILUCIÓN - MIGRACIÓN – DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

1. Lectura de los códigos de barras de cada tubo primario de muestra y del cargador correspondiente.
2. Dilución del suero con el diluyente contenido en el pocillo doble del segmento, seguido de la dispensación de la muestra diluida en los 6 pocillos restantes (solución ELP, anti-Ig G, anti-Ig A, anti-Ig M, anti-Kappa y anti-Lambda), con limpieza de la cánula de muestras entre cada dilución. El modo de dilución seleccionado previamente para esa muestra se aplicará automáticamente. Si no se ha definido el modo de dilución, se aplicará el modo de dilución "ESTÁNDAR".
3. Lavado de los capilares.
4. Inyección de las muestras diluidas en los capilares.
5. Migración a voltaje constante con temperatura regulada por efecto Peltier, durante unos 4 minutos.
6. Lectura a 200 nm y aparición simultánea de los perfiles proteicos en la pantalla del ordenador.

NOTA : Estas etapas se realizan consecutivamente para el primer cargador de muestras introducido : los perfiles correspondientes a la primera muestra analizada se obtienen después de 10 minutos. Para el cargador de muestras siguiente, las etapas 1 y 2 (lectura de los códigos de barras y dilución del suero) se realizan durante la etapa 5 del cargador anterior.

II. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Al acabar el análisis, cada uno de los perfiles obtenidos con los antisueros (Ig G, Ig A, Ig M, Kappa y Lambda) se superpone al perfil ELP. En caso de reacción entre la proteína monoclonal y el antisuero específico, el pico correspondiente desaparecerá del perfil electroforético del antisuero.
El análisis del suero diluido con el diluyente contenido en el segmento de antisueros es realizado durante el inmunotipado y permite obtener el perfil proteico de la muestra nativa (perfil "Ref"). Esta curva suplementaria permite comprobar la concordancia entre el análisis de proteínas y el inmunotipado.
Estas comparaciones permiten identificar y caracterizar el o los componentes monoclonales.

IMPORTANTE : El perfil proteico nativo (perfil "Ref") no se superpone, ni tampoco puede superponerse sobre ningún perfil de antisueros del inmunotipado.

III. FIN DE DE LA SECUENCIA DEL ANÁLISIS

Hay que realizar un procedimiento de extinción al acabar la sesión de trabajo para conservar los capilares en condiciones óptimas.

IV. LLENADO DE LOS CONTENEDORES DE REACTIVO

El aparato automático CAPILLARYS permite una gestión automática de los reactivos.

IMPORTANTE : Es necesario seguir el procedimiento previsto para el cambio de los contenedores (si no se hace correctamente los contenedores pueden despresurizarse y los análisis pueden verse afectados) y respetar el código de colores del contenedor – conector en cada cambio de contenedor.

La aparición de la ventana de gestión de los reactivos indica que es necesario cambiar uno o varios reactivos :

- colocar un nuevo contenedor de tampón de análisis y / o,
- llenar el contenedor de lavado con la solución de lavado reconstituida y / o,
- llenar el contenedor de limpieza con agua destilada o desionizada filtrada y / o,
- vaciar el contenedor de desechos.

ATENCIÓN : No use agua destilada o desionizada comercial, como por ejemplo el agua para planchar (riesgo de deterioro importante de los capilares). Use exclusivamente agua de calidad ultrapura, como el agua para inyección.

IMPORTANTE : Se recomienda lavar con agua destilada o desionizada en abundancia el contenedor de limpieza antes de llenarlo.

LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL CAPILLARYS.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda analizar un suero control (como el Control IT / IF SEBIA, referencia nº 4788) después de cada cambio de lote de uno de los reactivos.

NOTA : Si es necesario, el Suero Control Normal SEBIA, referencia n° 4785, puede ser usado como control negativo.

RESULTADOS

Interpretación para el análisis de sueros

Ausencia de proteína monoclonal

- La desaparición de las inmunoglobulinas policlonales en los perfiles de los antisueros (con disminución de las fracciones gamma y beta), sin desaparición de otros picos proteicos, se observa en el análisis de un suero normal o que presente una hipergammaglobulinemia.

Presencia de una proteína monoclonal

- Una gammapatía (presencia de una inmunoglobulina monoclonal) se caracteriza por la desaparición de un pico con uno de los antisueros anti-cadenas pesadas (gamma, alfa o mu) y con uno de los antisueros anti-cadenas ligeras (kappa o lambda). La fracción monoclonal detectada debe estar situada en la misma posición de migración que la banda detectada en el perfil ELP.
- La desaparición de un pico con uno de los antisueros anti-cadenas ligeras (kappa o lambda) sin desaparición de ese pico con uno de los antisueros anti-cadenas pesadas puede significar :
  a) la presencia de una gammapatía de Ig D ó Ig E que habrá que confirmar con las técnicas HYDRAGEL IF, SEBIA, con los antisueros anti-cadenas pesadas delta o épsilon,
  b) la presencia de una cadena ligera libre que habrá que confirmar con las técnicas HYDRAGEL BENCE JONES ó HYDRAGEL IF, SEBIA, con los antisueros específicos anti-cadenas ligeras libres kappa ó lambda.
- La desaparición de un pico con uno de los antisueros anti-cadenas pesadas, sin desaparición del mismo con los anti-cadenas ligeras es rara. Habrá que confirmar la presencia de una enfermedad de cadenas pesadas gamma, alfa o mu.

Presencia de varias proteínas monoclonales

- En presencia de varias proteínas monoclonales se aplica la misma interpretación. Estos casos, menos frecuentes, corresponden a la proliferación de varios clones de células B. Una gammapatía biclonal será detectada por la presencia de dos cadenas pesadas (idénticas o diferentes) y de dos cadenas ligeras (idénticas o diferentes), es decir, por la desaparición de los 2 picos con uno de los antisueros anti-cadenas pesadas (idénticas o diferentes) y con uno de los antisueros anti-cadenas ligeras (idénticas o diferentes).
- La desaparición de varios picos con uno de los antisueros anti-cadenas pesadas y con uno de los antisueros anti-cadenas ligeras es característica de una polimerización de las inmunoglobulinas.

  Para confirmar la presencia de un componente monoclonal en la muestra, será necesario realizar un tratamiento reductor con beta-mercaptoetanol y repetir el análisis tras el mismo. En este caso, prepare una solución reductora añadiendo un 1 % de beta-mercaptoetanol al Fluidil (SEBIA, referencia n ° 4587, 1 vial de 5 mL). Estando el sistema CAPILLARYS preparado para analizar muestras, añada 100 µL de solución reductora a 300 µL de suero puro. Agite en el vórtex y deje que incube durante 15 minutos como máximo y luego siga con el procedimiento habitual.

  IMPORTANTE : Después del tratamiento reductor con beta-mercaptoetanol, la muestra debe ser analizada inmediatamente ; no debe haber ningún otro cargador en espera de ser analizado en el sistema CAPILLARYS.

  Después del tratamiento reductor con ß-mercaptoetanol, la transformación de este perfil bi- o tri-clonal en perfil monoclonal permite concluir que sólo hay un clon. Por otra parte, hay que tener presente que el tratamiento del suero con ß-mercaptoetanol implica una degradación del complemento C3 (visualización de grandes deformaciones en la zona beta) y la posible aparición de un pico ancho entre las fracciones alfa-1 y albúmina.
- La desaparición de varios picos múltiples con uno o varios antisueros anti-cadenas pesadas y con los dos antisueros anti-cadenas ligeras es característica de un perfil oligoclonal.

Casos especiales :

- En caso de desaparición incompleta de un pico monoclonal en los perfiles de antisueros :
  Repita el análisis diluyendo más el suero. Seleccione el modo de dilución "ESTÁNDAR" en lugar del modo "HIPOGAMMA" e "HIPERGAMMA" en lugar de "ESTÁNDAR".
- Muestras que contengan una o más proteínas monoclonales de concentración muy elevada (en modo de dilución "HIPERGAMMA") :
  En este caso, el complejo formado con los antisueros aparece en forma de un pico ancho y grande entre las fracciones albúmina y alfa-1 ; la desaparición del (o de los) pico(s) monoclonal(es) puede no ser completa en los perfiles de antisueros.
- Muestras que contengan una o más proteínas monoclonales polimerizadas :
  En este caso, el complejo formado con los antisueros puede aparecer en forma de un pico ancho y grande entre las fracciones albúmina y beta-1.
- Proteínas monoclonales que migran en las zonas beta-1 o beta-2 :
  - En caso de ausencia de proteína monoclonal en la zona gamma, seleccione el tipo de dilución adaptado a la concentración de inmunoglobulinas de la muestra.
  - En caso de sospecha de que haya una proteína monoclonal adicional en la zona gamma, seleccione el tipo de dilución adaptado a la intensidad de esta proteína monoclonal.
- Presencia de biclonales :
  Las biclonales pueden ser debidas a inmuncomplejos o a gammapatías biclonales o, lo que es extremadamente raro, a reacciones cruzadas (ver Interferencias y limitaciones).
- Desaparición de Ig M en los perfiles de los antisueros Kappa y Lambda :
  En caso de sustracción completa de un pico con los antisueros anti-IgM, anti-cadenas ligeras Kappa y Lambda, se recomienda realizar un tratamiento reductor de la muestra con beta-mercaptoetanol (ver el párrafo anterior) y repetir el inmunotipado.
- En caso de reacciones múltiples simultáneas con los antisueros anti-cadenas pesadas G, A y M, se recomienda repetir el análisis de la muestra de suero seleccionando el modo de dilución "OPTIMIZADO".

Interferencias y limitaciones

Numerosos estudios han mostrado que la reacción antígeno – anticuerpo en fase líquida es diferente a la reacción que ocurre en un gel. La técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING se desarrolla totalmente en medio líquido, y puede suceder que algunos antisueros den lugar a reacciones cruzadas con algunas proteínas monoclonales presentes en la muestra.
No hay ningún riesgo de falsos negativos, es decir, de no detectar una gammapatía, pero esta reacción cruzada, extremadamente poco frecuente, se presenta como un diagnóstico de gammapatía biclonal cuando en realidad sólo hay una gammapatía monoclonal. En cualquier caso, la literatura indica que no hay diferencias entre los tratamientos de una gammapatía monoclonal y una gammapatía biclonal (Kyle *et al*, 1981).
En caso de duda sobre un perfil biclonal, se recomienda confirmar el resultado con las técnicas de inmunofijación HYDRAGEL.
En ocasiones pueden observarse leves desplazamientos entre el perfil ELP y los perfiles de antisueros superpuestos (especialmente en la zona beta-1). No deben confundirse con la desaparición de un pico monoclonal en uno o varios perfiles de antisueros.
Use únicamente los antisueros específicos para la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING.
Teniendo en cuenta los principios analíticos de las técnicas actuales (principios de la electroforesis de zona, resolución y sensibilidad), no hay garantías en cuanto a la detección total de todos los componentes monoclonales.
Ver MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS.
Cuando una proteína monoclonal es detectada mediante las técnicas de análisis de proteínas en el CAPILLARYS (técnica CAPILLARYS PROTEIN(E) 6) y no es caracterizada mediante la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING, se recomienda repetir el inmunotipado de la muestra, tratándola previamente con beta-mercaptoetanol (vea el párrafo anterior) y, si persiste la duda, confirmar el resultado obtenido usando una técnica de inmunofijación en gel de agarosa.

Resolución de problemas

Contacte con el Servicio de Asistencia Técnica de SEBIA en caso de que el análisis sea defectuoso.
Las fichas de datos de seguridad de los diferentes reactivos del kit, así como las informaciones relativas a la eliminación de los desechos, están disponibles en el Servicio de Asistencia Técnica de SEBIA.

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Reproducibilidad intraserial

Se analizaron cinco muestras de suero patológicas con gammapatía monoclonal y un suero normal usando la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING con el modo de dilución estándar, con 2 lotes diferentes de segmentos de antisueros ; cada segmento contenía el mismo reactivo en todos los pocillos (solución ELP, anti-Ig G, anti-Ig A, anti-Ig M, anti-Kappa y anti-Lambda).
Todas las muestras analizadas proporcionaron los mismos resultados con los 2 lotes de segmentos probados, y los perfiles obtenidos fueron los característicos de cada una de las muestras.
En la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING, el inmunotipado detectó sólo un componente monoclonal en las 5 muestras patológicas y no detectó ningún pico en el suero normal.

Reproducibilidad interserial e interlotes

Se analizaron nueve muestras de suero patológicas con gammapatía monoclonal, que presentaban concentraciones de inmunoglobulinas (Ig) diferentes, con la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING, usando el modo de dilución "HIPOGAMMA" en 3 sueros cuya concentración de Ig era < a 8 g/L, con el modo de dilución "ESTÁNDAR" en 3 sueros cuya concentración de Ig estaba comprendida entre 8 y 20 g/L, y con el modo de dilución "HIPERGAMMA" en 3 sueros cuya concentración de Ig era > a 20 g/L. Este análisis se repitió 4 veces con 3 lotes diferentes de segmentos de antisueros.
Todas las muestras analizadas proporcionaron los mismos resultados con los 3 lotes de segmentos probados, y los perfiles obtenidos eran los característicos de cada una de las muestras analizadas. En la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING, el inmunotipado detectó los picos monoclonales esperados en cada muestra.

Exactitud

Se analizaron 135 muestras de suero (119 muestras patológicas diferentes y 16 sueros normales) en paralelo, usando la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING y la técnica de inmunofijación en gel de agarosa HYDRAGEL 9 IF, SEBIA. Los resultados obtenidos mostraron una correlación del 95 % entre las dos técnicas :

- En los 16 sueros normales : correlación perfecta,
- En los 119 sueros patológicos :
    - 112 sueros mostraron una correlación perfecta,
    - 4 sueros que presentaban una proteína monoclonal en muy baja cantidad sobre un fondo policlonal importante mostraron una correlación parcial,
    - 3 sueros con un perfil oligoclonal con bandas múltiples también mostraron una correlación parcial.

En todos los casos, el diagnóstico clínico obtenido muestra una correlación perfecta entre los dos sistemas de análisis en todas las muestras analizadas, con una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 100 % respecto a la técnica de referencia, calculadas según el método recomendado (Wendling, 1986).

Sensibilidad

Se diluyeron serialmente tres sueros con una gammapatía monoclonal en un suero normal y se analizaron usando la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING.

Los resultados obtenidos se indican en la tabla siguiente.

MUESTRA N°	BANDA MONOCLONAL			LÍMITE DE DETECCIÓN (g/L)
	TIPO		CONCENTRACIÓN (g/L)	
1	Ig A, K	Alfa	5,0	0,25
		Kappa		0,25
2	Ig G, L	Gamma	2,0	0,25
		Lambda		0,25
3	Ig M, K	Mu	3,9	0,25
		Kappa		0,25

El límite de detección de un pico monoclonal es por tanto del orden de 0,25 g/L.

NOTA : El límite de detección de un pico monoclonal puede variar en función de la posición del pico monoclonal y del fondo policlonal de la zona de las gamma y beta globulinas.

ANÁLISIS DE ORINAS : TÉCNICA CAPILLARYS IMMUNOTYPING URINE

REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

ATENCIÓN : Ver las fichas de datos de seguridad.

1. KIT CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 (SEBIA, referencia 2003)

Presentación, conservación, estabilidad y señales de deterioro

Vea las instrucciones del kit.

ATENCIÓN : No use los segmentos de dilución contenidos en el kit CAPILLARYS PROTEIN(E) 6 para la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING URINE.

2. KIT CAPILLARYS / MINICAP URINE (SEBIA, referencia 2013)

Presentación, conservación, estabilidad y señales de deterioro

Vea las instrucciones del kit.

Uso

Permite preparar las muestras de orina para el análisis de las proteínas urinarias humanas mediante electroforesis capilar en el sistema automático CAPILLARYS.

3. AGUA DESTILADA O DESIONIZADA

Uso

Para la limpieza de los capilares del aparato automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS, SEBIA.
Se recomienda usar agua destilada o desionizada filtrada (con un filtro de porosidad ≤ 0,45 µm) y con una resistividad superior a 10 Megaohmios x cm.
Renueve el agua cada día para evitar contaminaciones microbianas.
Para un funcionamiento óptimo, se recomienda añadir 350 µL/L de CLEAN PROTECT (SEBIA, referencia n° 2059 : 1 vial de 5 mL).

IMPORTANTE : Se recomienda lavar el contenedor de limpieza con agua destilada o desionizada en abundancia antes de llenarlo.

4. CAPICLEAN

Presentación

El vial de la solución enzimática concentrada CAPICLEAN (SEBIA, referencia n° 2058 : 1 vial de 25 mL) contiene : enzimas proteolíticos, surfactantes y componentes inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

Uso

Para la limpieza de la cánula de muestras del aparato automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS, SEBIA, durante el ciclo de limpieza CAPICLEAN.

IMPORTANTE :

- Cuando se realicen menos de 500 análisis a la semana, haga un ciclo de limpieza con CAPICLEAN al menos una vez por semana.
- Cuando se realicen menos de 500 análisis al día pero más de 500 análisis a la semana, haga un ciclo de limpieza con CAPICLEAN cada 500 análisis.
- Cuando se realicen más de 500 análisis al día, haga un ciclo de limpieza con CAPICLEAN una vez al día.

Consulte la hoja de instrucciones del CAPICLEAN, SEBIA.

IMPORTANTE: Después de la limpieza de la cánula de muestras, no reutilice el segmento de dilución.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

CAPICLEAN debe conservarse en nevera (entre 2 y 8 °C). Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial. NO LO CONGELE.
Pueden observarse un precipitado o partículas agregadas en suspensión (flóculos) en el vial del CAPICLEAN sin que su funcionamiento se vea afectado.
No resuspenda el precipitado o las partículas. Se recomienda pipetear sólo el sobrenadante.

5. SOLUCIÓN DE HIPOCLORITO DE SODIO (para la limpieza de la cánula de muestras)

Preparación

Prepare una solución de hipoclorito de sodio (lejía) con un 2 - 3 % de cloro, a partir de una dosis concentrada de 250 mL con un 9,6 % de cloro diluida hasta 1 litro (volumen final) con agua destilada o desionizada fría.

Uso

Para la limpieza de la cánula de muestras del aparato automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS, SEBIA (mantenimiento semanal para eliminar proteínas adsorbidas a la cánula).

Vea las instrucciones de uso del CAPILLARYS, SEBIA.

- Use el cargador nº 100, específico para el mantenimiento.
- Coloque en el cargador, en la posición 1, un tubo de hemólisis que contenga 2 mL de solución de hipoclorito de sodio preparada con anterioridad.
- Introduzca el cargador nº 100 de mantenimiento en el sistema CAPILLARYS.
- En el menú de la ventana "MANTENIMIENTO" que aparecerá en pantalla, seleccione la opción "Iniciar la limpieza de la cánula (solución de hipoclorito de sodio)", y luego valide.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

La solución de hipoclorito de sodio diluida puede conservarse 3 meses a temperatura ambiente en un recipiente de plástico cerrado herméticamente, protegido de los rayos solares y de cualquier fuente de calor o ignición, y alejado de los ácidos y del amoniaco.

6. SOLUCIÓN DE LAVADO CAPILLARYS / MINICAP

Preparación

Cada vial de solución de lavado concentrada (SEBIA, referencia n° 2052: 2 viales de 75 mL) debe completarse hasta 750 mL con agua destilada o desionizada.
Después de la dilución, la solución de lavado contiene una solución alcalina pH ≈ 12.

Uso

Para lavar los capilares del CAPILLARYS. Reactivo adicional en caso de realizar series inferiores a 40 análisis.

IMPORTANTE : Antes de llenar el contenedor de solución de lavado, se recomienda lavar con agua destilada o desionizada en abundancia el cuello del contenedor, el conector y el tubo para evitar la acumulación de sales.

Conservación, estabilidad y señales de deterioro

Las soluciones de lavado concentrada y diluida deben conservarse a temperatura ambiente o en nevera en contenedores cerrados para evitar la evaporación. La solución concentrada es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial.
La solución diluida es estable durante 3 meses.
Deseche la solución de lavado diluida si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana.

NOTAS :

Las pruebas realizadas durante la validación de los reactivos muestran que, para las diferentes soluciones y usando material adaptado al volumen a reconstituir, una variación del volumen final de un ± 5 % no tiene ningún efecto adverso en el análisis.
El agua destilada o desionizada, usada para la reconstitución de las soluciones, debe estar exenta de contaminación bacteriana o fúngica (use un filtro ≤ 0,45 μm) y debe tener una resistividad superior a 10 Megohms x cm.

EQUIPAMIENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS

1. Sistema de electroforesis capilar CAPILLARYS SEBIA : CAPILLARYS referencia n° 1220, CAPILLARYS 2 referencia n° 1222 ó CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING referencia n° 1227.
2. Cargadores de muestras, suministrados con el sistema CAPILLARYS.
3. Contenedores de plástico suministrados con el sistema CAPILLARYS : contenedor para la limpieza de los capilares (debe llenarse con agua destilada o desionizada), contenedor de solución de lavado y contenedor de desechos.
4. Tubos de hemólisis de 75 mm de altura y 13 mm de diámetro.

MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS

Extracción y conservación de las muestras

El análisis se hace preferentemente con orinas frescas de 24 horas. Las orinas deben obtenerse según los procedimientos establecidos de uso en el laboratorio clínico.
Las muestras de orina puede conservarse una semana en nevera (entre 2 y 8 °C).
Para conservaciones más prolongadas, se recomienda congelar las muestras a – 70 °C ; las orinas congeladas son estables 1 mes como mínimo.

IMPORTANTE : No congele las orinas a – 20 °C.

Las muestras degradadas o descongeladas pueden presentar fracciones deformadas con aparición de pequeños picos suplementarios como consecuencia de la degradación de las proteínas.

NOTA : No conserve las muestras de orina a temperatura ambiente.

Preparación de las muestras

Prepare previamente las muestras de orina según el protocolo de preparación (diálisis y concentración) indicado en las instrucciones del kit CAPILLARYS / MINICAP URINE (vea el párrafo "Reactivos necesarios no suministrados").
Use directamente las muestras de orina preparadas.

IMPORTANTE : Para analizar las orinas mediante electroforesis capilar es necesario dializar y concentrar las muestras usando el sistema de diálisis SEBIA (tubos de 20 mL). Use un tubo por muestra. La muestra dializada y concentrada con este sistema puede ser analizada a continuación con las técnicas CAPILLARYS URINE y CAPILLARYS IMMUNOTYPING URINE.

Las muestras deben analizarse como mucho al día siguiente de su preparación. Para limitar la adsorción de las proteínas urinarias a la membrana del dispositivo de diálisis y concentración (sistema de diálisis SEBIA), se recomienda no conservar la muestra dentro del sistema de diálisis tras la centrifugación, sino dentro de un microtubo que puede guardarse en nevera (entre 2 y 8 °C).

Muestras a descartar

- No use muestras de orina antiguas o mal conservadas, ya que las fracciones estarían muy modificadas, debido a la degradación de las proteínas urinarias.
- Se recomienda observar el aspecto de la orina después de la primera centrifugación (por si hay hemólisis o turbidez).
- No use muestras conservadas en un dispositivo de diálisis y concentración, ya que algunas proteínas podrían haberse adsorbido a la membrana.

NOTA : Los tubos de extracción y los parámetros de centrifugación de muestras biológicas están descritos en la documentación disponible sobre la fase preanalítica de los análisis clínicos (datos suministrados por los fabricantes de tubos, guías y recomendaciones sobre la obtención de muestras biológicas…). En ausencia de indicaciones en las instrucciones sobre el tipo de tubo a usar o sobre la centrifugación, consulte esta documentación, y para las dimensiones del tubo a utilizar, consulte el documento de SEBIA "Características de los tubos a usar según el instrumento". La fase preanalítica debe realizarse con la tecnología más avanzada y siguiendo las diferentes recomendaciones, incluyendo las suministradas por los fabricantes de tubos, cumpliendo la reglamentación aplicable.

PROCEDIMIENTO

El sistema CAPILLARYS es un instrumento multiparamétrico automático que permite realizar el análisis de las proteínas urinarias en 6 capilares en paralelo con la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING URINE, según las etapas siguientes :
- lectura de los códigos de barras del cargador y de la muestra de orina que se va a analizar ;
- dilución de la muestra ;
- mezcla de la orina con la solución ELP y con los antisueros de las diferentes especificidades ;
- lavado de los capilares ;
- inyección de la muestra diluida ;
- separación y detección directa de las proteínas en los capilares.

Las etapas manuales son las siguientes :
- colocación de los microtubos (sin tapón), que contienen las muestras de orina preparadas que se van a analizar, en tubos de hemólisis, que sirven de soporte y permiten colocar las muestras en los cargadores ; cada tubo de soporte debe estar identificado con el código de barras correspondiente a la muestra que se vaya a analizar ;
- colocación de un segmento de antisueros destapado en cada cargador de muestras ;
- introducción en el sistema CAPILLARYS ;
- recuperación de los cargadores después del análisis.

Un análisis electroforético previo realizado en el sistema CAPILLARYS con el kit CAPILLARYS / MINICAP URINE habrá permitido seleccionar las muestras en las que el perfil proteico presenta un pico anormal mediante examen visual de los resultados.

LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL CAPILLARYS.

I. PREPARACIÓN DEL ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO

1. Seleccione las muestras cuyo perfil proteico obtenido con la técnica CAPILLARYS URINE ha permitido detectar un pico anormal después del análisis cualitativo.
2. Encienda el CAPILLARYS y el ordenador de control.
3. Abra el programa de gestión PHORESIS (CAPILLARYS) y valide el nivel de los reactivos, tras lo cual el aparato se iniciará automáticamente. Después de unos 10 minutos el sistema CAPILLARYS estará listo para trabajar.
4. Para cada muestra, en el perfil proteico obtenido con el programa de análisis "URINE", determine el valor del "Ratio orina" del pico anormal que quiera caracterizar (vea el párrafo "Tratamiento de los datos" de las instrucciones del kit CAPILLARYS / MINICAP URINE). El "Ratio orina" se define a partir del cociente entre la superficie del pico anormal y la superficie total de las proteínas del Suero Control Normal.
5. Seleccione el modo de dilución que se aplicará automáticamente según el valor del "Ratio orina" :
   • "HIPOGAMMA" si el valor del "Ratio orina" es inferior a 0,55,
   • "ESTÁNDAR" si el valor del "Ratio orina" está comprendido entre 0,55 y 1,55,
   • "HIPERGAMMA" si el valor del "Ratio orina" es superior a 1,55.

   NOTA : Cuando el "Ratio orina" está situado a un ± 10 % del valor límite (0,55 ó 1,55), se recomienda seleccionar el modo de dilución en función del pico proteico anormal que se quiera caracterizar con la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING URINE :
   - para mejorar la sensibilidad de detección de un pico de intensidad débil, diluya menos la muestra, es decir, seleccione el modo de dilución "HIPOGAMMA" en lugar del "ESTÁNDAR" o el "ESTÁNDAR" en lugar del "HIPERGAMMA",
   - para mejorar el inmunotipado de un pico de intensidad fuerte, aumente la dilución de la muestra, es decir, seleccione el modo de dilución "ESTÁNDAR" en lugar del "HIPOGAMMA" o el "HIPERGAMMA" en lugar del "ESTÁNDAR".
6. Para el análisis de orinas, use el kit CAPILLARYS IMMUNOTYPING con el programa de análisis "IMMUNOTYPING URINE" y el tampón de análisis CAPILLARYS PROTEIN(E) 6. Para seleccionar el programa de análisis "IMMUNOTYPING URINE" y colocar el contenedor de tampón CAPILLARYS PROTEIN(E) 6, lea detenidamente el manual de instrucciones del CAPILLARYS.

   NOTA : El paso de la técnica (modo de trabajo) CAPILLARYS URINE a la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING URINE (e inversamente) no requiere cambiar el contenedor de tampón.
7. Ponga 1 tubo de hemólisis vacío (que servirá de soporte) en la posición 1 de cada cargador, y luego coloque el microtubo que contiene la muestra de orina dializada en el tubo de hemólisis, asegurándose de haber cortado el tapón del microtubo.
8. Conserve el tapón de cada microtubo para la conservación posterior de la muestra en caso de que sea necesario.

   IMPORTANTE : Se recomienda identificar los tubos de hemólisis, que sirven de soporte a los microtubos que contienen las muestras de orina a analizar, con los códigos de barras correspondientes a las muestras de orina.
9. Coloque el código de barras del tubo orientado hacia la ventana de lectura.
   En caso de que la muestra colocada en el cargador no forme parte de las orinas seleccionadas previamente, se aplicará el modo de dilución "HIPOGAMMA".
10. Para cada muestra que vaya a analizar, coja un segmento de antisueros nuevo, saque la lámina que la precinta y colóquelo en el mismo cargador en el que está el tubo de hemólisis que sirve de soporte al microtubo con la muestra preparada (en caso de ausencia del segmento, el cargador será expulsado).

    NOTA : Los segmentos tienen una forma característica, con un saliente que evita colocarlos al revés en los cargadores del sistema CAPILLARYS.

11. Introduzca el (o los) cargador(es) en el sistema CAPILLARYS por el orificio de entrada situado en medio del aparato. Se pueden introducir hasta trece cargadores de muestras a la vez, pudiéndose añadir nuevos cargadores de forma continua a medida que se vaya completando el análisis de los cargadores ya introducidos.
12. Saque de la cinta de salida, situada a la izquierda del aparato, los cargadores ya analizados.
13. Coja con precaución el segmento de antisueros usado y deséchelo.

    ATENCIÓN : Manipule con precaución los segmentos de antisueros que contengan muestras biológicas.

DILUCIÓN - MIGRACIÓN - DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

1. Lectura de los códigos de barras del cargador y de la muestra de orina correspondiente.
2. Dilución de la orina dializada con el diluyente contenido en el pocillo doble del segmento, seguido de la dispensación de la muestra diluida en los 6 pocillos restantes (solución ELP, anti-Ig G, anti-Ig A, anti-Ig M, anti-Kappa y anti-Lambda), con limpieza de la cánula de muestras entre cada dilución. El modo de dilución seleccionado previamente para esa muestra se aplicará automáticamente. Si no se ha definido el modo de dilución, se aplicará el modo de dilución "HIPOGAMMA".
3. Lavado de los capilares.
4. Inyección de las muestras diluidas en los capilares.
5. Migración a voltaje constante con temperatura controlada por efecto Peltier, durante unos 4 minutos.
6. Lectura a 200 nm y aparición simultánea de los perfiles proteicos en la pantalla del ordenador.

NOTA : Estas etapas se realizan consecutivamente para el primer cardador de muestras introducido : los perfiles correspondientes a la primera muestra analizada se obtienen después de 10 minutos. Para el cargador de muestras siguiente, las fases 1 y 2 (lectura de los códigos de barras y dilución de la orina dializada) se realizan durante la etapa 5 del cargador de muestras anterior.

II. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Al acabar el análisis, cada uno de los perfiles obtenidos con los antisueros (Ig G, Ig A, Ig M, Kappa y Lambda) se superpone sobre el perfil ELP. En caso de reacción entre la proteína monoclonal y el antisuero específico, el pico correspondiente desaparecerá del perfil electroforético del antisuero. Estas comparaciones permiten identificar y caracterizar el o los componentes monoclonales.
En el análisis de orinas, las posiciones de las diferentes zonas proteicas (Albúmina, Alfa 1, Alfa 2, Beta y Gamma) son indicadas en la pantalla de edición y en el informe de resultados.

III. FIN DE LA SECUENCIA DEL ANÁLISIS

Hay que realizar un procedimiento de extinción al acabar la sesión de trabajo para conservar los capilares en condiciones óptimas.

IV. LLENADO DE LOS CONTENEDORES DE REACTIVO

El aparato automático CAPILLARYS permite una gestión automática de los reactivos.

IMPORTANTE : Es necesario seguir el procedimiento previsto para el cambio de los contenedores (si no se hace correctamente los contenedores pueden despresurizarse y los análisis pueden verse afectados) y respetar el código de colores contenedor – conector en cada cambio de contenedor.

La aparición de la ventana de gestión de los reactivos indica que es necesario cambiar uno o varios reactivos :

- colocar un nuevo contenedor de tampón de análisis y / o,
- llenar el contenedor de lavado con la solución de lavado reconstituida y / o,
- llenar el contenedor de limpieza con agua destilada o desionizada filtrada y / o,
- vaciar el contenedor de desechos.

ATENCIÓN : No use agua destilada o desionizada comercial, como por ejemplo el agua para planchar (riesgo de deterioro importante de los capilares). Use exclusivamente agua de calidad ultrapura, como el agua para inyección.

IMPORTANTE : Se recomienda lavar con agua destilada o desionizada en abundancia el contenedor de limpieza antes de llenarlo.

LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL CAPILLARYS.

RESULTADOS

Interpretación para el análisis de orinas

<u>Ausencia de proteína monoclonal</u>

- La desaparición de las inmunoglobulinas policlonales en los perfiles de los antisueros (con disminución de las fracciones gamma y beta), sin la desaparición de otros picos proteicos, se observa en el análisis de una orina normal o que presente una proteinuria glomerular con paso a la orina de inmunoglubulinas policlonales.

<u>Presencia de una proteína monoclonal</u>

- La presencia de una inmunoglobulina monoclonal completa se caracteriza por la desaparición de un pico con uno de los anti-cadenas pesadas (gamma, alfa o mu) y con uno de los anti-cadenas ligeras (kappa o lambda). La fracción monoclonal detectada debe estar situada en la misma posición de migración que la banda detectada en el perfil ELP.
- La desaparición de un pico con uno de los anti-cadenas ligeras (kappa o lambda) sin desaparición de ese pico con uno de los anti-cadenas pesadas puede significar la presencia de una cadena ligera libre, que habrá que confirmar con las técnicas HYDRAGEL BENCE JONES o HYDRAGEL IF, SEBIA, con los antisueros específicos anti-cadenas ligeras libres kappa o lambda.
- La desaparición de un pico con uno de los anti-cadenas pesadas, sin desaparición del mismo con los anti-cadenas ligeras es rara. Habrá que confirmar la presencia de una cadena pesada gamma, alfa o mu.

<u>Presencia de varias proteínas monoclonales</u>

- La desaparición de varios picos con uno de los antisueros anti-cadenas ligeras puede observarse en caso de polimerización de las cadenas ligeras libres.

Casos especiales :

- En caso de desaparición incompleta de un pico monoclonal en los perfiles de los antisueros, repita el análisis diluyendo más la orina. Seleccione el modo de dilución "ESTÁNDAR" en lugar del modo "HIPOGAMMA", e "HIPERGAMMA" en lugar de "ESTÁNDAR".
- Muestras que contienen una o más proteínas monoclonales de concentración muy elevada (en modo de dilución "HIPERGAMMA") :
  En este caso, el complejo formado con los antisueros aparece en forma de un pico ancho y grande en las zonas albúmina y alfa-1 ; la desaparición del (o de los) pico(s) monoclonal (es) puede no ser completa en los perfiles de antisueros.
- La desaparición de 2 picos con uno de los antisueros anti-cadenas ligeras, y de un solo pico con uno de los antisueros anti-cadenas pesadas, es debida a la presencia de una inmunoglobulina completa asociada a una cadena ligera libre.
- Se recomienda seleccionar el modo de dilución en función de la intensidad del pico proteico anormal que quiera caracterizar, para mejorar la sensibilidad de detección de un pico de intensidad débil o el inmunotipado de un pico de intensidad fuerte (ver el párrafo "Preparación del análisis electroforético").

Interferencias y limitaciones

Numerosos estudios han mostrado que la reacción antígeno – anticuerpo en fase líquida es diferente de la reacción que ocurre en un gel. La técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING URINE se desarrolla totalmente en medio líquido, y puede suceder que algunos antisueros den lugar a reacciones cruzadas con algunas proteínas monoclonales presentes en la muestra.
No hay ningún riesgo de falsos negativos, es decir, de no detectar una gammapatía, pero esta reacción cruzada, extremadamente poco frecuente, se presenta como un diagnóstico de gammapatía biclonal cuando en realidad sólo hay una gammapatía monoclonal. En cualquier caso, la literatura indica que no hay diferencias entre los tratamientos de una gammapatía monoclonal y una gammapatía biclonal (Kyle *et al*, 1981).
En caso de duda sobre un perfil biclonal, se recomienda confirmar el resultado con las técnicas de inmunofijación HYDRAGEL.
En ocasiones pueden observarse leves desplazamientos entre el perfil ELP y los perfiles de antisueros superpuestos (especialmente en la zona beta-1). No deben confundirse con la desaparición de un pico monoclonal en uno o varios perfiles de antisueros.
Use únicamente los antisueros específicos para la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING URINE.
Teniendo en cuenta los principios analíticos de las técnicas actuales (principios de la electroforesis de zona, resolución y sensibilidad), no hay garantías en cuanto a la detección total de todos los componentes monoclonales.
Vea MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS.

Resolución de problemas

Contacte con el Servicio de Asistencia Técnica de SEBIA en caso de que el análisis sea defectuoso.
Las fichas de datos de seguridad de los diferentes reactivos del kit, así como las informaciones relativas a la eliminación de los desechos, están disponibles en el Servicio de Asistencia Técnica de SEBIA.

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Reproducibilidad intraserial

Se analizaron cinco muestras patológicas con una gammapatía monoclonal o biclonal y una muestra normal, usando la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING URINE con el modo de dilución "HIPOGAMMA", con 2 lotes diferentes de segmentos de antisueros ; cada segmento contenía el mismo reactivo en todos los pocillos (solución ELP, antisueros anti-Ig G, anti-Ig A, anti-Ig M, anti-Kappa y anti-Lambda).
Todas las muestras analizadas proporcionaron los mismos resultados con los 2 lotes de segmentos probados, y los perfiles obtenidos fueron los característicos de cada una de las muestras.
En la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING URINE, el inmunotipado detectó los componentes monoclonales en las 5 muestras patológicas con gammapatía monoclonal o biclonal y no detectó ningún pico en la muestra normal.

Reproducibilidad interserial e interlotes

Se analizaron siete muestras patológicas con una gammapatía monoclonal o biclonal y una muestra normal, que presentaban concentraciones proteicas diferentes, con la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING URINE, usando el modo de dilución "HIPOGAMMA" para 4 muestras cuyo ratio orina era < a 0,55, con el modo de dilución "ESTÁNDAR" para 2 muestras cuyo ratio orina estaba comprendido entre 0,55 y 1,55, y con el modo de dilución "HIPERGAMMA" para 2 muestras cuyo ratio orina era > a 1,55. Este análisis se repitió 4 veces con 3 lotes diferentes de segmentos de antisueros.
Todas las muestras analizadas proporcionaron los mismos resultados con los 3 lotes de segmentos probados, y los perfiles obtenidos eran los característicos de cada una de las muestras analizadas. En la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING URINE, el inmunotipado detectó los picos monoclonales esperados en cada una de las 7 muestras patológicas.
El análisis de la muestra normal permitió detectar un fondo policlonal sin presencia de pico anormal.

Exactitud

Se analizaron en paralelo treinta y tres (33) muestras de orina patológicas diferentes (con paraproteínas o con cadenas ligeras libres Kappa o Lambda), 22 muestras con un perfil policlonal y 6 muestras normales, usando la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING URINE y la técnica de inmunofijación en gel de agarosa HYDRAGEL 9 BENCE JONES, SEBIA (técnica de referencia), para investigar la presencia de paraproteínas y cadenas ligeras libres.
Los resultados obtenidos mostraron una correlación perfecta entre los dos sistemas de análisis, con una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 100 % respecto a la técnica de referencia, calculadas según el método recomendado (Wendling, 1986) :
En las 6 muestras de orina normales : correlación perfecta.
En las 22 muestras de orina con perfil policlonal : correlación perfecta.
En las 33 muestras patológicas : correlación perfecta.
Se detectó la presencia de paraproteínas o de cadenas ligeras libres en todas las muestras patológicas con los dos sistemas de análisis.

Sensibilidad

La sensibilidad (o límite de detección mínimo) de la técnica CAPILLARYS IMMUNOTYPING URINE para la detección de las cadenas ligeras libres Kappa y Lambda, obtenida mediante dilución serial de muestras de orina con proteínas de Bence Jones, es del orden de 25 mg/L para las muestras analizadas con los antisueros anti-Kappa y anti-Lambda del kit CAPILLARYS IMMUNOTYPING.

BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAPHY

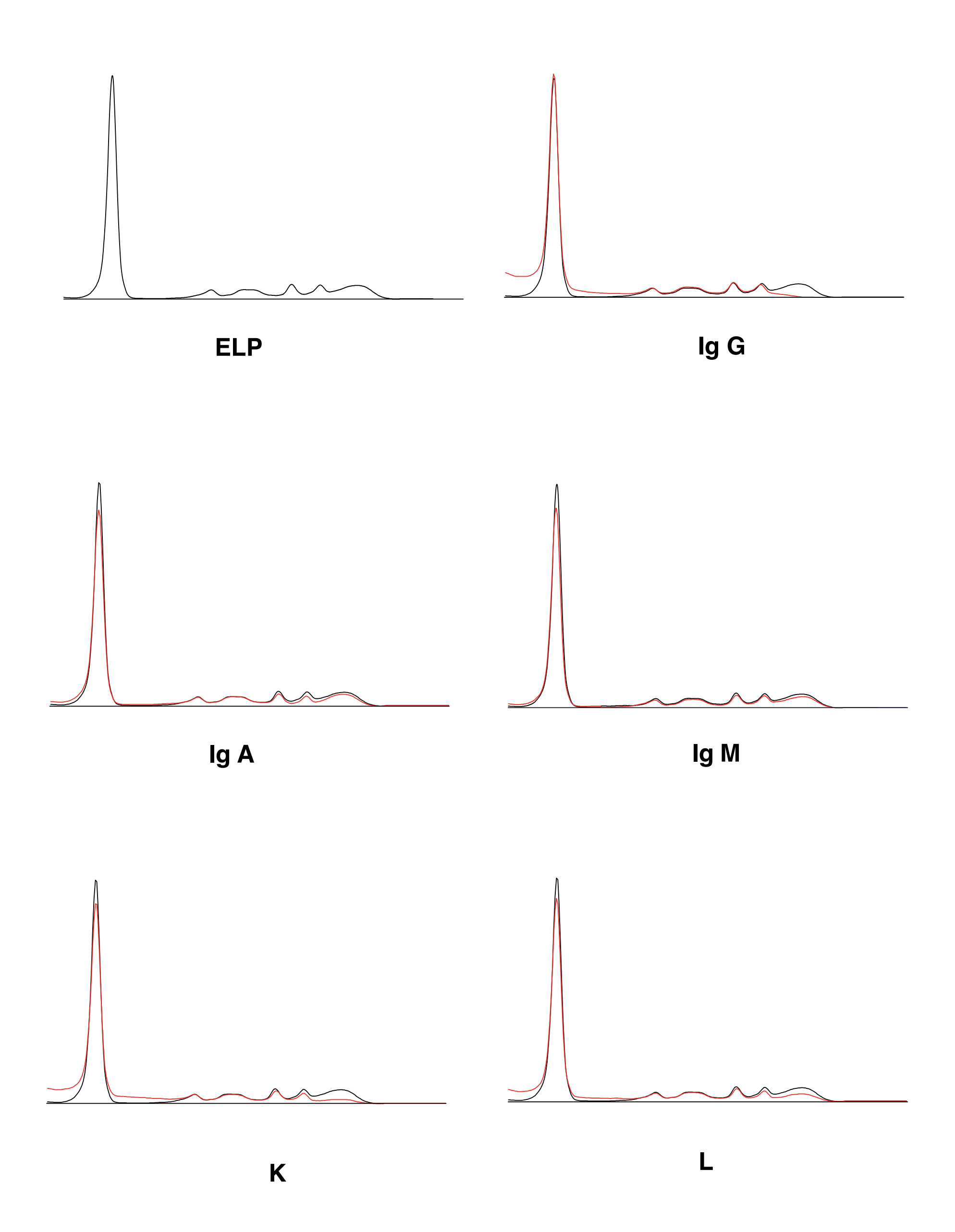
1. Cameron JS. 1987. The nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis*, 10 : 157-171.
2. Chopin N. 1991. Étude de la protéinurie. *Inf Tech Biol*, 1 : 23-28.
3. Clark R *et al*. Rapid capillary electrophoretic analysis of human serum proteins : qualitative comparison with high-throughput agarose gel electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 744, 205 - 213 (1996).
4. Gay-Bellile C, Bengoufa D, Houze P, Le Carrer D, Benlakehal M, Bousquet B, Gourmel B, Le Bricon T. Automated multicapillary electrophoresis for analysis of human serum proteins. *Clin. Chem.*, 49, 1909 - 1915 (2003).
5. Henskens Y *et al*. Detection and identification of monoclonal gammopathies by capillary electrophoresis. *Clin. Chem.*, 44, 1184 - 1190 (1998).
6. Jellum E *et al*. Journal of Chromatography Biomedical Applications : Diagnostic applications of chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B*, 689, 155 - 164 (1997).
7. Jenkins MA and Guerin MD. Journal of Chromatography Biomedical Applications : Capillary electophoresis procedures for serum protein analysis : comparison with established techniques. *J. Chromatogr. B*, 699, 257 - 268 (1997).
8. Joachim GR, Cameron JS, Chwartz M, Belker EL. 1964. Selectivity of protein excretion in patients with the nephrotic syndrome. *J Clin Invest,* 43, 2332-2346.
9. Katzmann JA *et al*. Identification of monoclonal proteins in serum : A quantitative comparison of acetate, agarose gel, and capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 18, 1775 - 1780 (1997).
10. Keren DF. Detection and characterization of monoclonal components in serum and urine. *Clin. Chem.*, 44, 6, 1143 – 1145 (1998).
11. Kyle RA, Robinson RA, Katzmann JA. The clinical aspects of biclonal gammopathies. Review of 57 cases. *Am. J. Med.*; 71, 6, 999 - 1008 (1981).
12. Landers JP. Clinical Capillary Electrophoresis. *Clin. Chem.*, 41, 495 - 509 (1995).
13. Le Bricon T. 2002. Identification et dosage des proteines urinaires au laboratoire d'analyses. *Ann Biol Clin*, 60 : 525-540.
14. Le Carrer D. 1990. Protéinuries : Mise au point sur leur exploration biologique en 1990. *L'Eurobiologiste*, 190 : 395-405.
15. Le Carrer D, Nicolas A, Ducasse L. 1992. L'analyse des protéinuries au laboratoire de biologie en 1992. *Revue française des laboratoires*, 225 : 41-47.
16. Le Carrer D, Chopin N. 1994. Profil protéique urinaire : Proposition d'un protocole d'exploration biologique des protéinuries. *Revue française des laboratoires*, 269 : 29-37.
17. Philipon C. 1989. Protéines urinaires : Intérêt clinique et interprétation. *Technique et Biologie*, 6 : 239-249.
18. Oda RP *et al*. Capillary electrophoresis as a clinical tool for the analysis of protein in serum and other body fluids. *Electrophoresis*, 18, 1715 - 1723 (1997).
19. Waller KV, Ward KM, Mahan JD, Wismatt DK. 1989. Current concepts in proteinuria. *Clin Chem*, 35 : 755-765.
20. Westermeier R., "Electrophoresis in Practice. A Guide to Theory and Practice", VCH Publishers, New York, NY, 1993.
21. Wendling A. Procédures de diagnostic ou de dépistage : Justification et validité d'un test de diagnostic ou de dépistage-sensibilité-spécificité. *Impact-Internat*, 1986 ; Sept : 93 - 97.
22. L. Guis, A. Chaumier, V. Le Gall, S. Havrez (Février 2013) Intégration du Capillarys 2 Flex Piercing (Sebia) dans un laboratoire de biologie médicale spécialisée. *Revue Francophone des Laboratoires*, 449, 47 – 56.

SCHÉMAS / FIGURES

PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES DE SÉRUMS - ELECTROPHORETIC PATTERNS OF SERUM SAMPLES

Sérum Normal / Normal serum

Figure 1

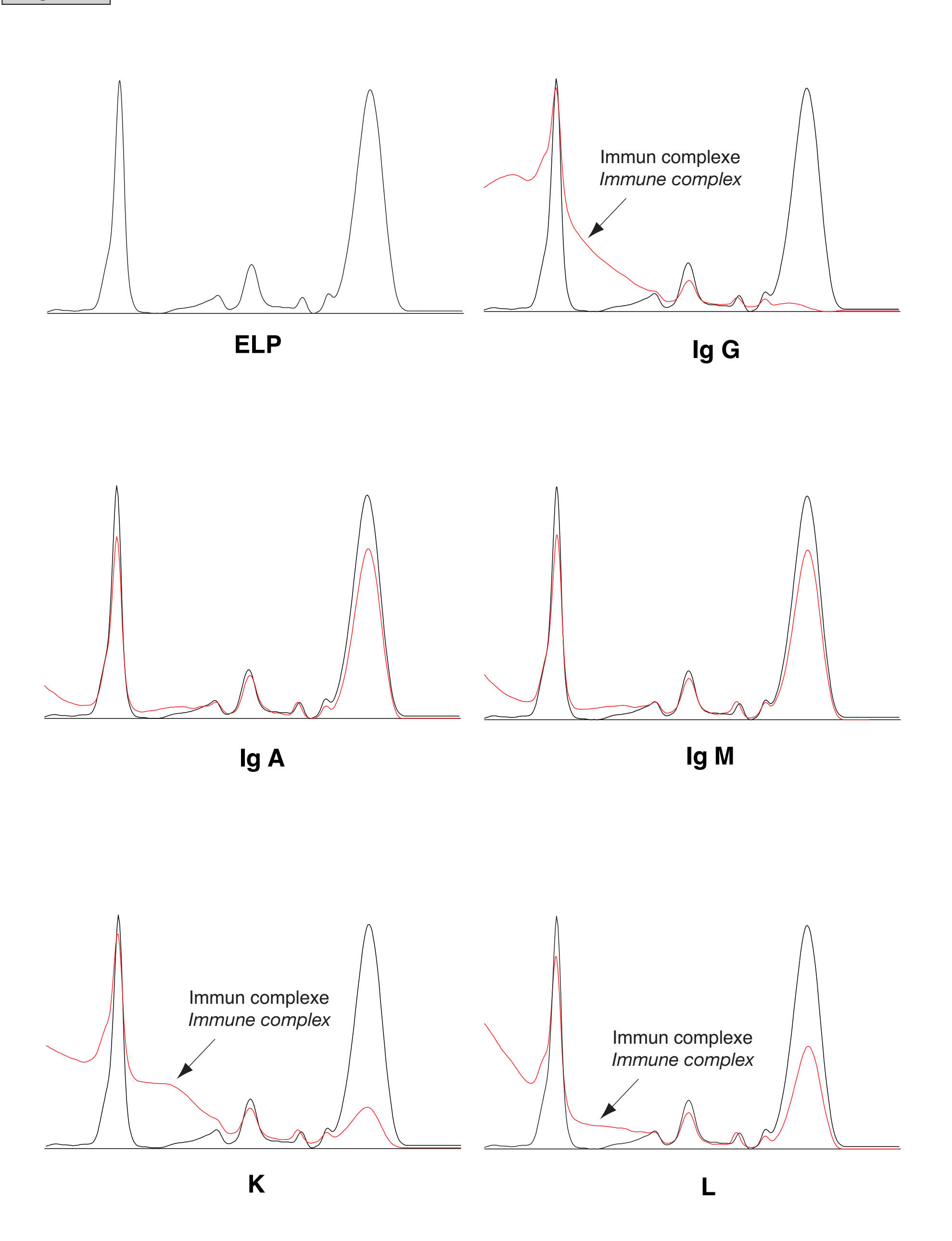


SCHÉMAS / FIGURES

PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES DE SÉRUMS - ELECTROPHORETIC PATTERNS OF SERUM SAMPLES

Sérum Hypergamma / Hypergamma serum

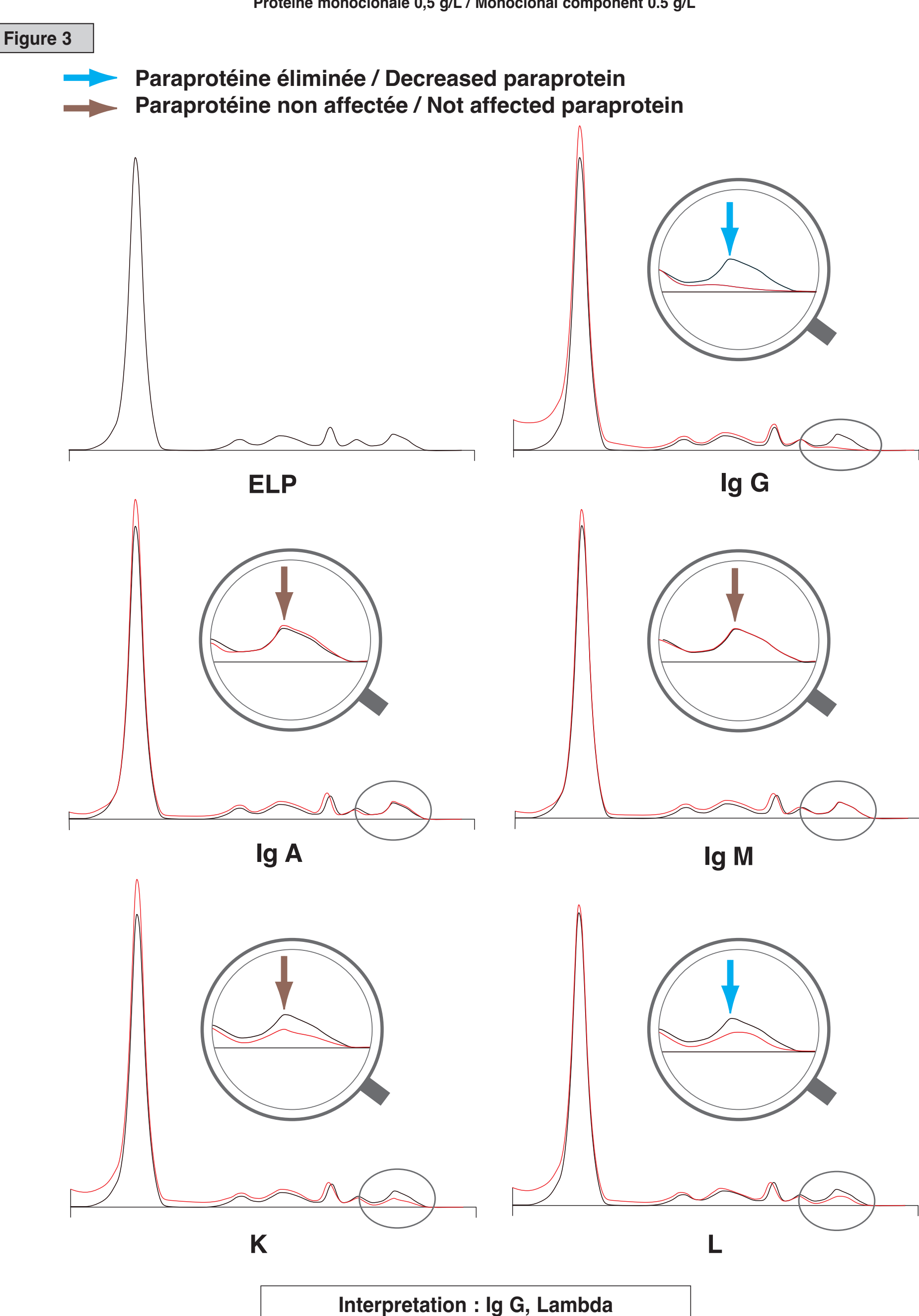
Figure 2



SCHÉMAS / FIGURES

PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES DE SÉRUMS - ELECTROPHORETIC PATTERNS OF SERUM SAMPLES

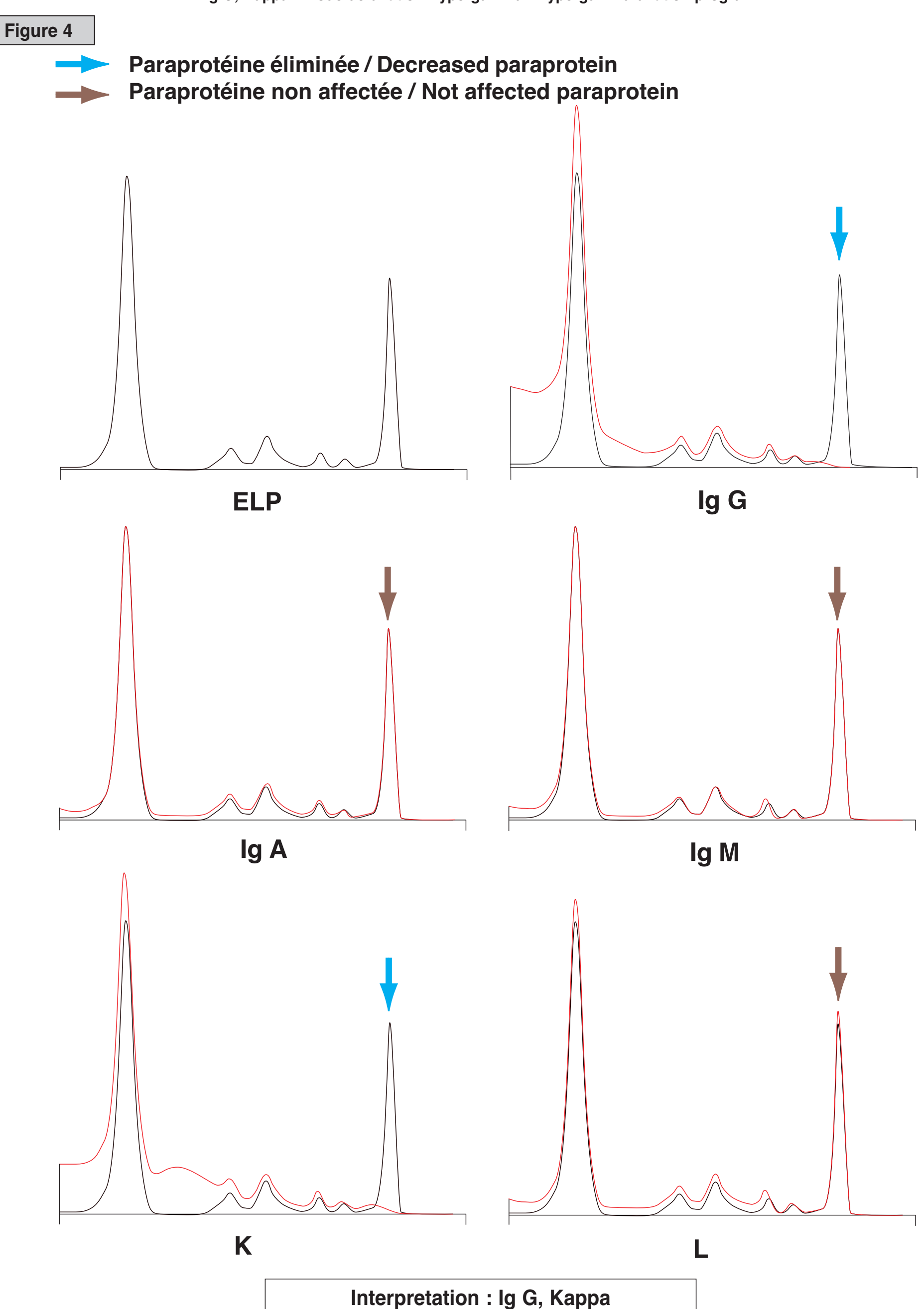
Protéine monoclonale 0,5 g/L / Monoclonal component 0.5 g/L



SCHÉMAS / FIGURES

PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES DE SÉRUMS - ELECTROPHORETIC PATTERNS OF SERUM SAMPLES

Ig G, Kappa - mode de dilution Hypergamma / Hypergamma dilution program



SCHÉMAS / FIGURES

PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES DE SÉRUMS - ELECTROPHORETIC PATTERNS OF SERUM SAMPLES

Profil biclonal / Biclonal pattern : Ig G, Kappa + Ig M, Kappa

Figure 5

Paraprotéine éliminée / Decreased paraprotein

Paraprotéine non affectée / Not affected paraprotein

ELP

Ig G

Ig A

Ig M

K

L

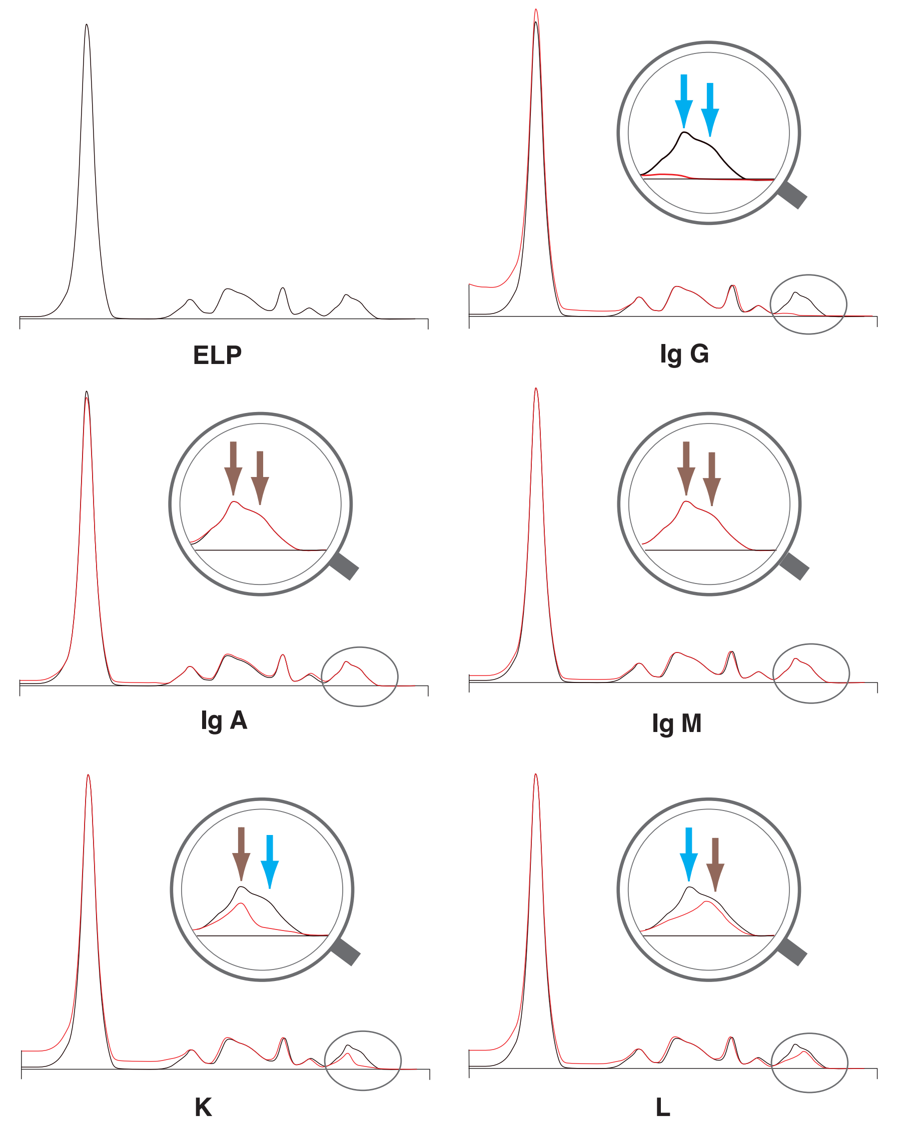
Interpretation : Ig G, Kappa + Ig M, Kappa

SCHÉMAS / FIGURES

PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES DE SÉRUMS - ELECTROPHORETIC PATTERNS OF SERUM SAMPLES

Profil biclonal / Biclonal pattern : Ig G, Kappa + Ig G, Lambda

Figure 6



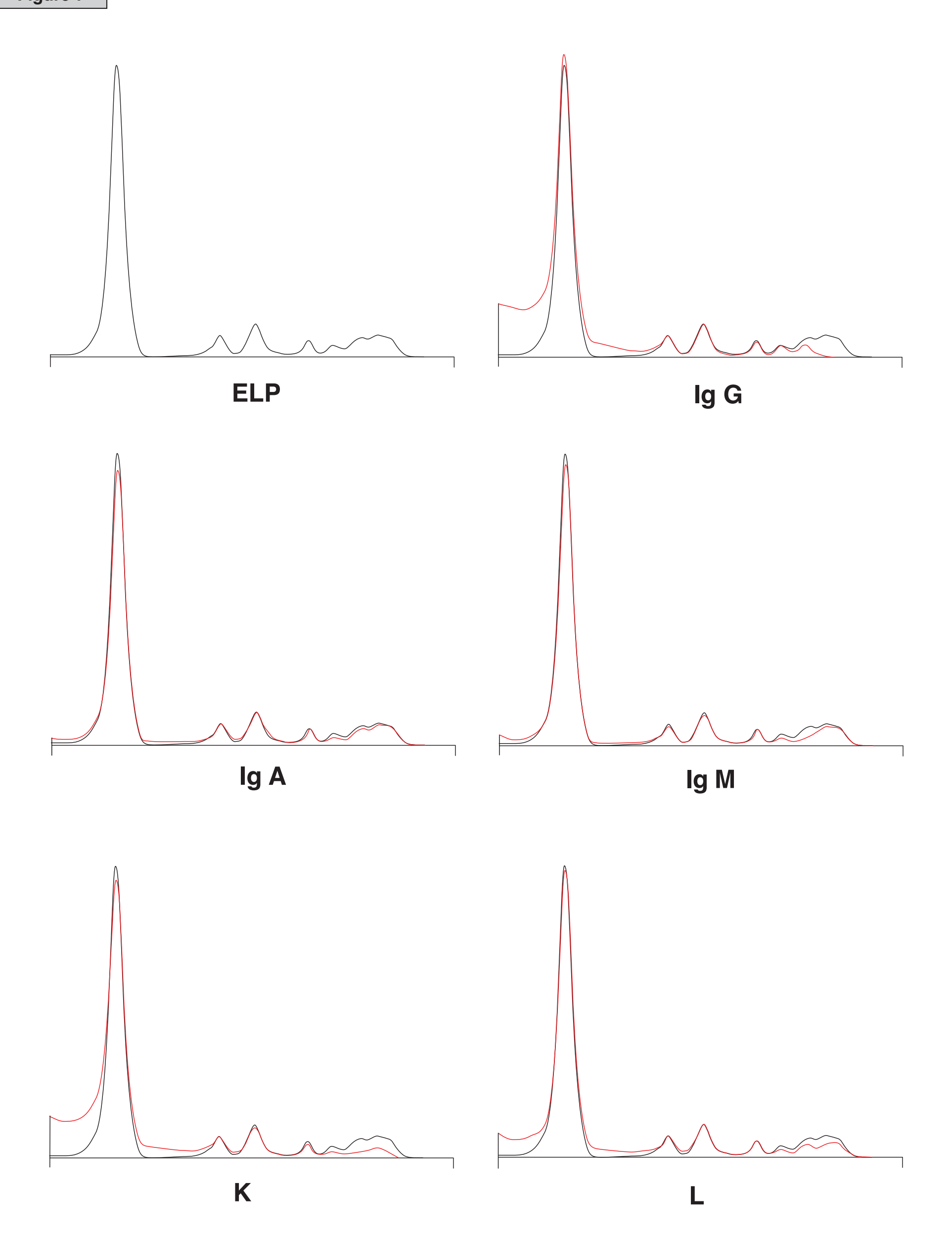
Interpretation : Ig G, Kappa + Ig G, Lambda

SCHÉMAS / FIGURES

PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES DE SÉRUMS - ELECTROPHORETIC PATTERNS OF SERUM SAMPLES

Profil oligoclonal / Oligoclonal pattern

Figure 7

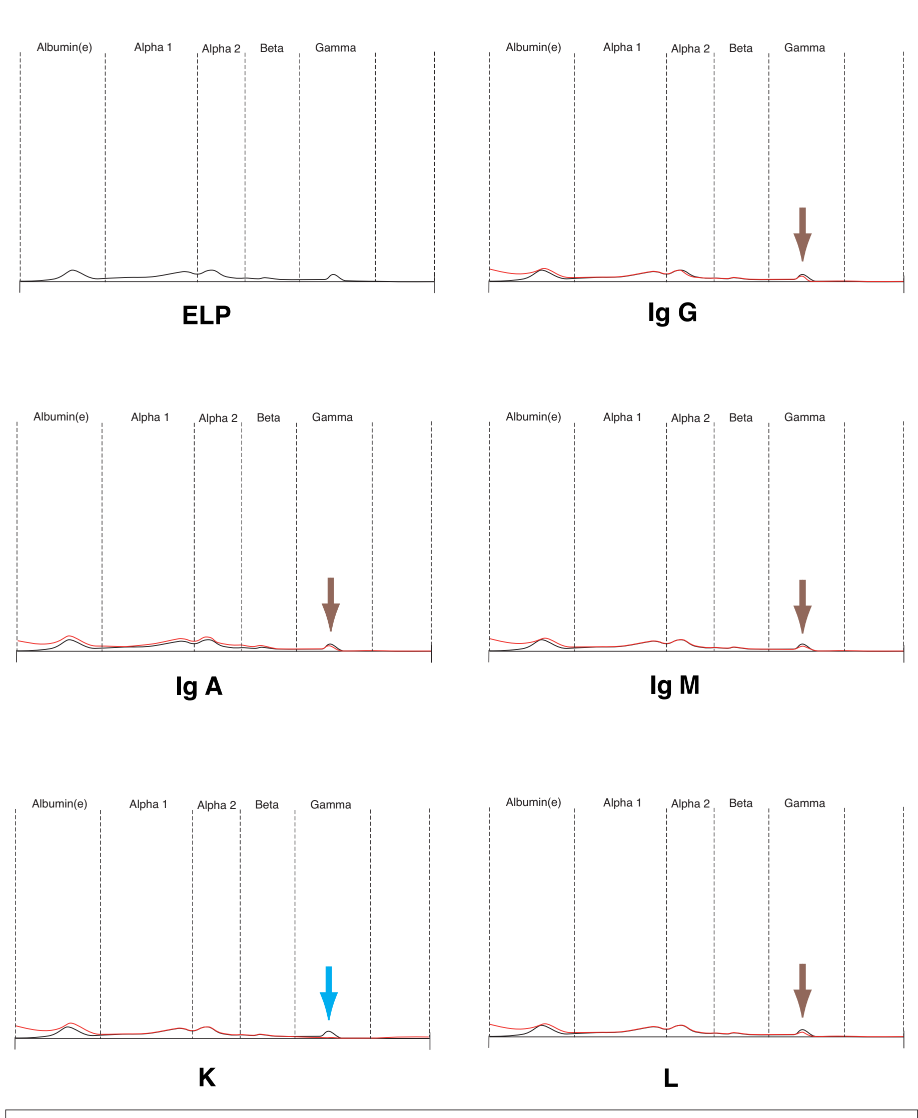


SCHÉMAS / FIGURES

PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES D'URINES - ELECTROPHORETIC PATTERNS OF URINE SAMPLES

Proteine monoclonale / Monoclonal component – mode de dilution Hypogamma / Hypogamma dilution program

Figure 8

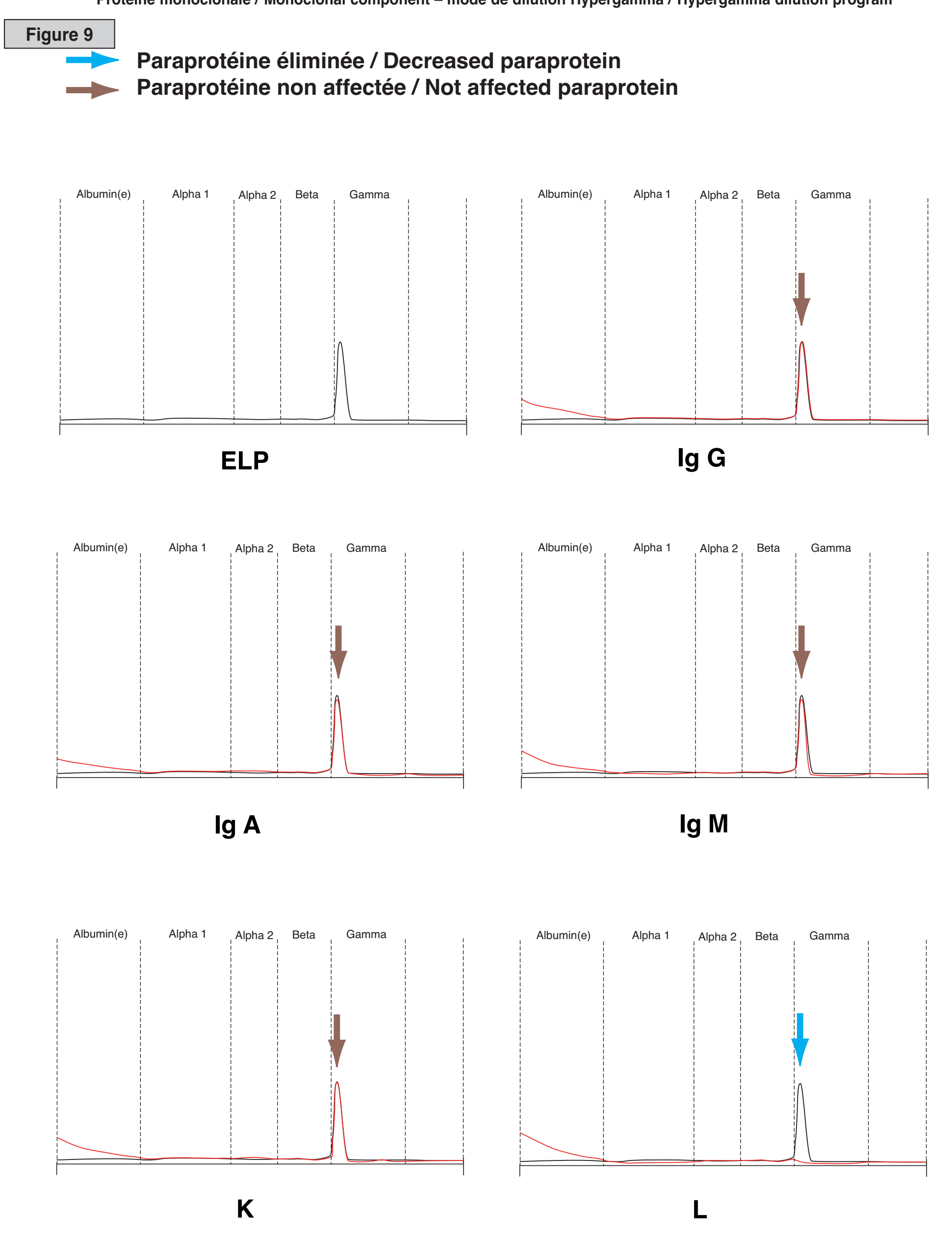


Interpretation : **Suspicion de chaîne légère libre Kappa (à confirmer)**
Kappa free light chain suspected (to confirm)

SCHÉMAS / FIGURES

PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES D'URINES - ELECTROPHORETIC PATTERNS OF URINE SAMPLES

Proteine monoclonale / Monoclonal component – mode de dilution Hypergamma / Hypergamma dilution program



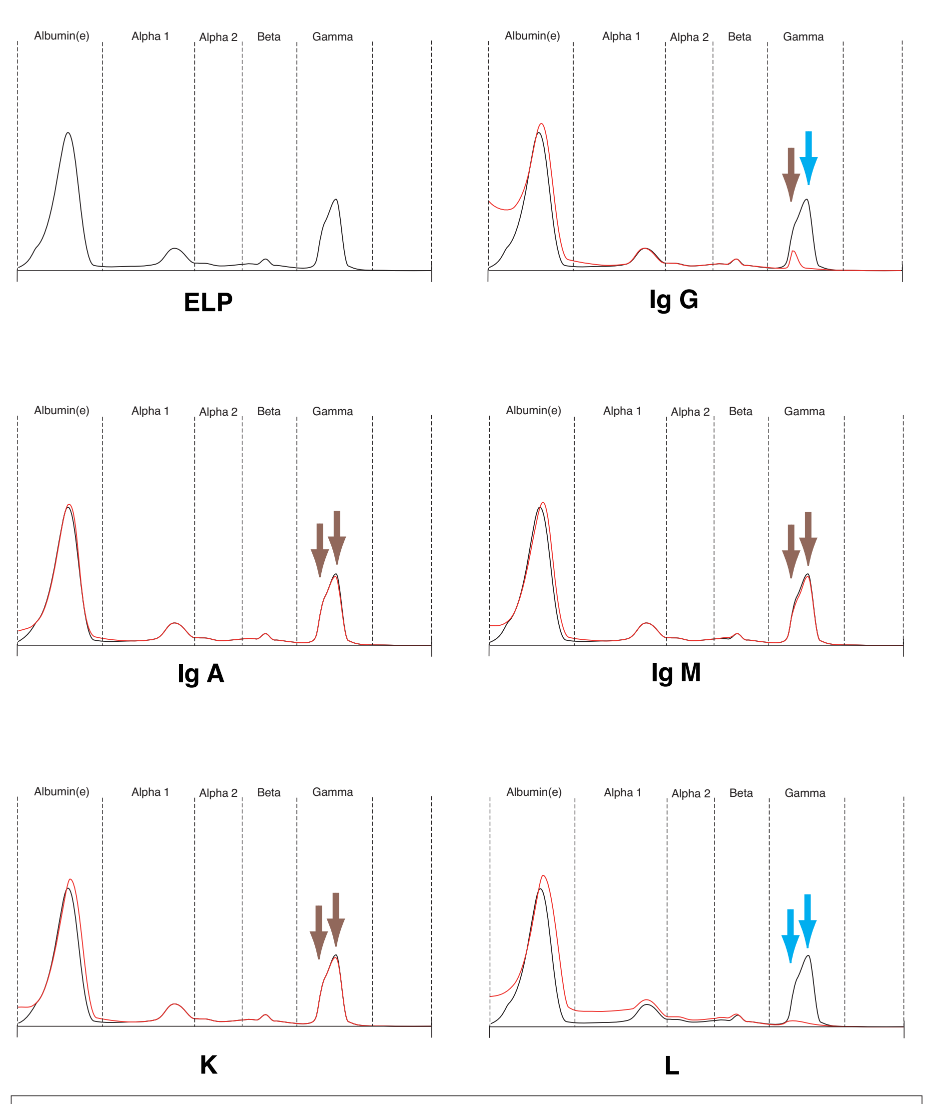
Interpretation :	Suspicion de chaîne légère libre Lambda (à confirmer) Lambda free light chain suspected (to confirm)

SCHÉMAS / FIGURES

PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES D'URINES - ELECTROPHORETIC PATTERNS OF URINE SAMPLES

Profil biclonal / Biclonal pattern – mode de dilution Hypogamma / Hypogamma dilution program

Figure 10



Interpretation : **Ig G, Lambda + suspicion de chaîne légère libre Lambda (à confirmer)**
Ig G, Lambda + Lambda free light chain suspected (to confirm)